



08-06

One Step RT-PCR Kit RT-PCR Quick Master Mix

(Code No.:PCR-311)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

【1】 前言	1
【2】 产品内容	2
【3】 其他必需品	4
【4】 使用方法	6
【5】 相关操作步骤	8
【6】 常见问题	11
【7】 相关产品	12

【 注意 】

本试剂盒中所含的试剂均为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652, and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent (such as the patented 5' Nuclease Process claims in US Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

【1】 前言

RT-PCR Quick Master Mix是利用来源于 *Thermus thermophilus* HB8 菌株的重组型耐热性DNA多聚酶rTth DNA polymerase在 2 价锰离子(Mn^{2+})存在条件下具有强逆转录活性的特点开发的单酶一步法的RT-PCR试剂盒(2×Master Mix)系列之一。采用热启动法,更可进行高灵敏度检测。由于逆转录反应和PCR在同一反应体系内连续进行,试剂的加样只需一次即可完成,适合用于高通量分析。另外,也降低了样品间交叉污染的危险。

◆本产品的特征◆

1. 逆转录反应和PCR在同一反应体系内连续进行

以 RNA 为模板,由于逆转录反应和 PCR 在同一离心管内连续进行,适合用于快速、高通量分析的实验。另外,也降低了样品间交叉污染的危险。

2. 适用于容易形成高级结构或高GC含量的目的片段

逆转录反应和 PCR 用单一的耐热性酶 rTth DNA polymerase 进行。与普通的逆转录酶相比较,由于逆转录反应在高温下进行,适用于容易形成高级结构的模板 RNA 的反应,且提高了遗传基因引物的特异性。而且,由于 Tth DNA polymerase 对高 GC 含量的序列的扩增很有效,因此可进行高效率的扩增。

3. 快速热启动

RT-PCR Quick Master Mix 采用了使用抗 DNA 多聚酶抗体的热启动法。使用抗体的热启动对非特异性反应有非常强的抑制效果。另外,由于加热会使抗体迅速失活,可使酶重新拥有活性,因此可将高温对模板 DNA 和酶的损害减低到最小。

※ 注意※

由于本品未使用镁离子 (Mg^{2+}),而是使用了锰离子 (Mn^{2+}),PCR的保真性较低。因此,PCR产物容易引起突变,不推荐用于遗传基因克隆等目的。如要进行高保真性的RT-PCR,请使用本公司的两步法RT-PCR试剂盒「ReverTra -Plus-」。(请参照[7]相关产品)。

【2】 产品内容

◆ 本产品包含以下几个部分。

品名及内容	保存条件	容量
2×RT-PCR Quick Master Mix	-20°C(或 4°C 条件下 2 个月内)	625μl×2
50mM Mn(OAc)₂	-20°C	200μl
Nuclease-free Water	-20°C	1100μl
Positive Control RNA (human G3PDH mRNA, 5×10⁵copies/μl)	-20°C	50μl
Control Primer F(10pmol/μl)	-20°C	50μl
Control Primer R(10pmol/μl)	-20°C	50μl

2×RT-PCR Quick Master Mix

本品是含有反应缓冲液、dNTPs、rTth DNA Polymerase及抗DNA多聚酶抗体等的2×PCR反应溶液。添加模板RNA、引物、Mn(OAc)₂溶液，用Nuclease-free Water配制成1×浓度后使用。

请在-20°C冻结保存本品。融解后，请缓慢将其混合均匀后再使用。使用后，请再次于-20°C冻结保存。虽然反复冻融10次左右对品质没有影响，但应尽量避免。如果每次使用量较少，建议将其分装成小包装后单独保存。另外，如在短时间内需持续使用时，可于4°C冷藏保存，并在2个月内使用完毕。

50mM Mn(OAc)₂

本品是反应必须的锰离子溶液。通常按反应体系的1/20 volume(终浓度2.5mM)添加。根据目的片段RNA浓度和种类的不同，也可适量增减添加量，以提高反应效率。

请于-20°C保存。

Nuclease-free Water

经过滤处理去除了DNase和RNase的Nuclease-free级别的灭菌蒸馏水。为避免影响聚合酶的活性，未经过DEPC处理。

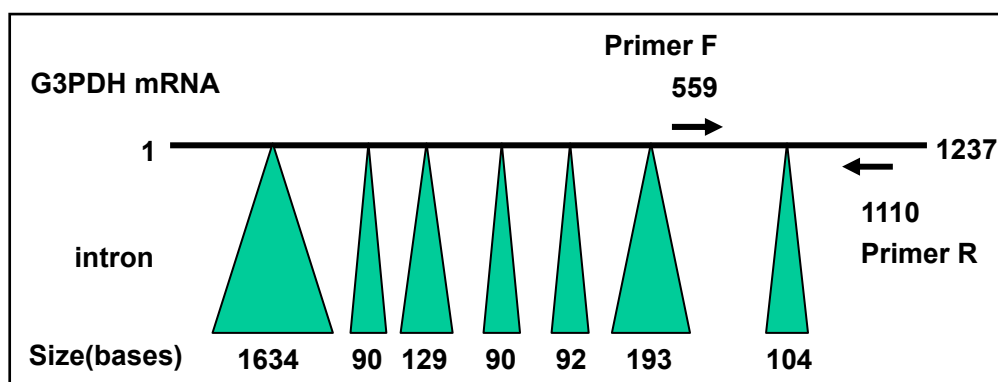
Control Primer F, Control Primer R (10pmol/μl)

本品是对甘油醛(glyceraldehyde)-3-磷酸脱氢酶(dehydrogenase)(G3PDH 和 GAPDH)进行配对的特异性引物。该引物对可对 G3PDH 的 2 个外显子约 450bp 的区域 (mRNA、cDNA 的情况下) 进行扩增。和添附的 Positive Control RNA 一起, 可作为 RT-PCR 反应体系的 Positive Control 使用。

另外, G3PDH是从各种哺乳动物的组织中发现的house keeping遗传基因, 它不受含有的部分识别位点、Phorbol Ester等的诱导物质的影响而保持恒定。因此, 当实验中用到从各种组织中抽提出来的total RNA、poly(A)⁺ RNA时, 可作为内部参照使用。该引物对可用于 human、mouse、rat、swine的G3PDH。

※ 引物的配对

Control Primer F : 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (20mer)
Control Primer R : 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (20mer)



G3PDH用Control Primer的结合位点

Positive Control RNA(human G3PDH mRNA, 5× 10⁵copies/μl)

本品是来源于 *in vitro* 转录 human 的 G3PDH mRNA。在末端附加了 22mer 的 poly(A) tail。与添附的 Control Primer F 及 Control Primer R 一起, 可作为 RT-PCR 反应体系的 Positive Control 使用。

【3】 其他必需品

◆ 除本产品之外，请再准备以下几种试剂和仪器。

•PCR仪及PCR用离心管

本产品适用于各种类型的PCR仪。仪器具体的使用方法请参照各PCR仪的说明书。

•Primer

请准备目的遗传基因配对用的Forward Primer和Reverse Primer。由于灵敏度很高，如要得到定量性的数据，引物的设计是重要的。如有可能，请将扩增区域设在跨内含子的区域。这样就可以防止来源于基因组DNA的扩增。本产品所包含的Reverse Primer作为逆转录引物直接使用时，不能使用Random Primer和Oligo(dT) Primer。

•Nuclease-free Water

本产品已添附了Nuclease-free Water，此外请再准备一些Nuclease-free Water，以便在稀释模板RNA和引物时使用。推荐使用经过滤处理配制的Nuclease-free Water。也可以使用经DEPC处理过的水，但残留的DEPC会抑制反应的进行，因此请使用高压灭菌器彻底清除DEPC之后再使用。此外，为防止核酸的混入，用于PCR反应的Nuclease-free Water，建议和用于其它实验的Nuclease-free Water分开保存，避免共用。

•Total RNA

使用本产品，可以把Total RNA直接作为模板使用。通过AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)法等提纯的Total RNA中，混有基因组DNA。对于在检测的目标中存在很多假基因的情况，以及跨内含子位置不能设计引物的情况，可能是因为由混入的基因组DNA产生的假阳性信号引起的。请采取必要的措施（如：DNase I等）清除基因组DNA。

从组织、培养细胞等得到Total RNA中，作为表达分析对象的mRNA的含量通常为1-2%。

•poly(A)⁺ RNA (mRNA)

利用poly(A)⁺ RNA和Oligo(dT)杂交后，选择性地分离出仅有poly(A)⁺末端的mRNA。在提纯过程中浓缩mRNA，是为了在高灵敏度下能够检测mRNA。但是，与Total RNA相比mRNA更容易受到RNase的分解，也不能以ribosomal RNA为内参来进行相对定量。

◆ 对RT-PCR的结果进行电泳分析时，请再准备以下几种试剂和仪器。

(1) 试剂类

- 电泳凝胶
- 电泳用缓冲液
- DNA Size Marker
- 电泳用Loading Dye

(2) 仪器类

- 凝胶电泳装置
- 凝胶成像系统
- 微型离心机

【4】 使用方法

◆ 以下为标准的实验步骤。

(1) 反应液的配制

反应液组成（例）

Nuclease-free Water	up to 50 μ l
2 \times RT-PCR Quick Master Mix	25 μ l
50mM Mn(OAc) ₂	2.5 μ l（终浓度2.5mM）
Forward Primer	10pmol（终浓度0.2 μ M）
Reverse Primer	10pmol（终浓度0.2 μ M）
RNA Sample	<2.5 μ g
<hr/>	
Total volume	50 μ l

※ 使用添附的引物对及Positive Control RNA时

Nuclease-free Water	16.5 μ l
2 \times RT-PCR Quick Master Mix	25 μ l
50mM Mn(OAc) ₂	2.5 μ l（终浓度2.5mM）
Control Primer F(10pmol/ μ l)	10pmol（终浓度0.4 μ M）
Control Primer R(10pmol/ μ l)	10pmol（终浓度0.4 μ M）
Positive Control RNA(5 \times 10 ⁵ copies/ μ l)	2.5 μ l(10 ⁶ copies)
<hr/>	
Total volume	50 μ l

- **Nuclease-free Water**请使用本产品中添附的，或者自己配制的，也可以使用市售的RNase-free级别水。建议使用经过滤处理配制的RNase-free水。也可以使用经DEPC处理过的水，但残留的DEPC会抑制反应的进行，因此请使用高压灭菌器彻底清除DEPC之后再使用。此外，为防止核酸的混入，用于PCR反应的Nuclease-free Water，建议和用于其它实验的Nuclease-free Water分开保存，避免共用。
- 各引物添加量请在2–6pmol（终浓度0.2–0.6 μ M）的范围内进行调整。扩增效率不高时，可适当增加引物的用量，但是引物过量，可能会导致非特异性增加，检测灵敏度下降。
- Mn(OAc)₂的添加量基本上为终浓度2.5mM。但根据RNA样品浓度和扩增目的片段序列的不同，也可适量增减添加量，以提高反应效率。
- RNA样品的添加量，在Total RNA的情况下为2.5 μ g以下，在poly(A)⁺ RNA (mRNA) 的情况下为500ng以下。过多的添加量是反应效率低下的原因之一。

(2) PCR的实施

RT-PCR温度的设定 (例)

Denature	90°C	30sec.
RT	60°C	30min.
Denature	94°C	1min.
PCR	94°C	30sec.
(40 cycles)	50-70°C	30sec.
	72°C	1min.
Elongation	72°C	7min.

- 由于本产品采用了快速热启动法(请参考p.2), 因此, 最初的变性时间可以设定为90°C、30秒。请注意不要过分加热, 以免降低酶活性, 影响模板RNA的稳定。
- PCR的温度、循环数根据目的片段的不同可作适当的调整。也可进行两步法PCR。

【5】 相关操作步骤

1. Total RNA的DNase I处理

在通过AGPC法等提纯的Total RNA内混有基因组DNA，可能会发生由基因组DNA产生假阳性信号的情况，请根据需要采用以下方法清除基因组DNA。

(1) 反应液的配制

反应液组成（例）

Distilled Water(DNase-free grade)	up to 10 μ l
Total RNA	x μ l
10 \times DNase I Buffer	1 μ l
RNase-free DNase I(10U/ μ l)	0.5 μ l
<hr/>	
Total volume	10 μ l

(2) 反应和提纯

配制好上述的反应液，静置于冰上10-30分钟，使其反应。

↓

在反应液内添加100 μ l的Nuclease-free Water、100 μ l的TE饱和苯酚，用vortex使其充分混合后，静置于冰上5分钟。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，回收上清液。

↓

添加100 μ l的氯仿后使其混合。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，回收上清液。

↓

添加5 μ l的20mg/ml糖原溶液（共同沉淀剂）、100 μ l的5M醋酸铵、200 μ l的异丙醇，使其混合后在-20 $^{\circ}$ C条件下静置30分钟。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，弃上清液。

↓

在沉淀中加入70%乙醇。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，弃上清液。

↓

在沉淀中加入适量的Distilled Water，使其溶解。

2. Poly(A)⁺ RNA提纯法

在进行检测表达量较少的遗传基因时，从Total RNA中提取poly(A)⁺ RNA进行纯化后作为模板使用，可以提高灵敏度。在此介绍一个poly(A)⁺ RNA提纯法的例子：通过使用Oligo(dT)结合磁珠的专用提纯试剂盒MagExtractor[®] -mRNA- (Code No. NPK-801)的方法。

(1) DNase I反应液的配制和提纯前的处理

反应液组成（例）

MagExtractor [®] -mRNA- 溶出液	up to 100μl
Total RNA(~100μg)	xμl
10×DNase I Buffer	10μl
RNase-free DNase I(10U/μl)	1μl
Total volume	100μl

配制好以上的反应混合液后，置于冰上反应15分钟。

↓

在反应液内添加400μl的溶解液（含2-巯基乙醇）和800μl的吸附液。

(2) 反应和提纯

在新的1.5ml离心管内加入250μl磁珠。

↓

使用磁力架Magical Trapper (Code No. MGS-101)等进行固液分离（B/F分离）后，弃上清液。

↓

添加上述经过事先处理的Total RNA溶液。

↓

用vortex充分搅拌（至均匀程度）后，在室温下放置10分钟。

↓

进行固液分离（B/F分离）后，弃上清液。

↓

添加1ml的洗净液。

↓

用vortex充分搅拌（至均匀程度）。

↓

进行固液分离（B/F分离）后，弃上清液。

↓

添加1ml的洗净液。

↓

用vortex充分搅拌（至均匀程度）。

↓

进行固液分离（B/F分离）后，弃上清液。

↓

添加1ml的洗净液。

↓

（转下页）

(接上页)

↓

用vortex充分搅拌（至均匀程度）。

↓

进行固液分离（B/F分离）后，弃上清液。

↓

进行离心后，再弃上清液。

↓

添加适量的溶出液。

↓

用vortex充分搅拌（至均匀程度）。

↓

65°C、2分钟。

↓

用vortex充分搅拌（至均匀程度）。

↓

离心。

↓

进行固液分离（B/F分离）后，回收含有poly(A)⁺ RNA的上清液。

•MagExtractor[®] -mRNA-的标准操作，需要反复进行2次上述的提纯。经过2次反复提纯，能够清除1次提纯未能完全清除的rRNA和基因组DNA。通常情况下，只需提纯1次，但如需要获取高纯度的poly(A)⁺ RNA时，请进行2次提纯。

•关于此提纯法的详细介绍参考MagExtractor[®] -mRNA-附带的使用说明书。

【6】 常见问题

1. 在电泳时无法检测出目的条带

原因	对策
模板RNA的纯度较低或已被降解	请重新提纯模板RNA。
模板RNA的量太少	请增加模板RNA的添加量。
引物的T _m 值与PCR条件不符	重新探讨结合温度。一般情况下最适合温度为比T _m 值低5℃。由于T _m 值会随计算方法和PCR Buffer的组成不同而发生变化，因此建议根据具体情况适当调整结合温度。
引物浓度太低	各引物浓度请在0.2-0.6μM的范围内进行调整。另外，Reverse Primer的浓度上升到1μM的程度，有可能改善逆转录的效率。
Mn(OAc) ₂ 浓度太低	通常在反应体系中添加2.5mM，提高浓度有可能改善PCR的效率。

2. 非特异性反应很多

原因	对策
引物浓度太高	引物的浓度请控制在0.2μM，根据具体情况，也可降低到0.2μM以下。
引物的特异性太低	请重新设计引物。引物的GC含量在40-60%比较适当。请确认引物内部是否没有互补的序列、两个引物的3'末端是否没有互补的序列。

3. 在空白样品中检测出条带

原因	对策
阳性样品和PCR产物的污染	首先请更换空白样品（水）。如能不能得到解决，请分别更换蒸馏水、引物、试剂等，重新进行实验。

【7】 相关产品

配置 RNA 的相关试剂

产品名	规格	Code No.
利用磁珠简单方便地提纯mRNA的试剂盒 MagExtractor[®] -mRNA-	5次	NPK-801
利用磁珠简单方便地提纯Total RNA的试剂盒 MagExtractor[®] -RNA-	100次	NPK-201
通过磁珠简单地进行提纯的专用磁力架 Magical Trapper	1个	MGS-101

2-step PCR 相关试剂

产品名	规格	Code No.
高性能逆转录酶ReverTra Ace [®] 和KOD Dash的组合 高灵敏度2-step RT-PCR Kit ReverTra Dash[®]	100次	PCR-401
高性能逆转录酶ReverTra Ace [®] 和KOD -Plus-的组合 最适合用于克隆的高保真性2-step RT-PCR Kit ReverTra -Plus-[®]	100次	PCR-501

[制造・销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 **188** 号汤臣商务中心 **C** 座 **310** 室

邮编：**200122**

交货期限・订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容・技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：